

罗汉果茎尖脱毒技术研究

吴群英¹, 李伯林², 李景云³

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西师范大学, 广西 桂林 541004; 3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

摘要:以罗汉果组培苗为试材,在高温热处理不同天数后剥取茎尖,进行罗汉果花叶病毒脱毒技术研究,同时采用间接 ELISA 法和电镜观察法检测其脱毒效果。结果表明:适合罗汉果热处理的时间为 7~15 d,试管苗的成活率可达 90%~100%;38.5℃热处理 10 d 剥取 0.2~0.5 mm 的茎尖进行培养,脱毒率为 100%。

关键词:罗汉果花叶病毒;茎尖脱毒;酶联免疫法

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)03-0102-03

罗汉果为葫芦科(Cucurbitaceae)罗汉果属植物[*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey]的成熟果实,主产于广西永福、临桂和龙胜等县,其性凉味甘,无毒,有润肺止咳、凉血、润肠通便的功效,是我国传统出口商品之一,在港澳地区、东南亚和欧美国家颇受欢迎^[1]。近年来,广西罗汉果产业发展迅猛,罗汉果种植面积不断扩大,越来越多的企业加入到罗汉果组培苗产业化生产的行列,在罗汉果种苗供应中,组培苗已占据主导地位^[2-3]。组培苗规格统一,可供种苗数量大,技术上可以脱毒,但由于种种原因,广西罗汉果主产区均普遍发生病毒病,严重地块发病率达 100%,受害植株减产 25%~45%,严重的达 50%以上,导致罗汉果品质下降,次果增加,造成了巨大的经济损失^[4]。当前对罗汉果危害最大的是花叶病毒,脱毒培养罗汉果种苗是去除花叶病的是一种有效措施^[5]。2001 年秦碧霞等^[6]报道了罗汉果花叶病毒间接酶联免疫吸附法(ELISA)检测技术,为罗汉果花叶病的诊断提供了可靠方法,但目前尚鲜见有关该技术应用用于罗汉果脱毒苗检测的研究报道。该研究以罗汉果组培苗为试材,进行热处理后剥取微茎尖培养,并采用间接 ELISA 法和电镜观察法检测罗汉果茎尖苗的脱毒效果,探讨罗汉果组培苗的脱毒技术,为大规模生产罗汉果优质种苗提供科学依据和关键技术。

第一作者简介:吴群英(1976-),女,硕士,讲师,研究方向为药用植物资源的保护与利用。E-mail:qunyingwu@126.com.

责任作者:李伯林(1964-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物细胞工程育种研究工作。E-mail:libolin-2006@163.com.

基金项目:广西教育厅科研资助项目(桂教教科研字(2000)第 392 号。)

收稿日期:2012-10-22

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为课题组继代培养、感染了罗汉果花叶病毒的青皮品种组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 热处理 将组培苗置于 38.5℃光照培养箱中进行热处理培养,分别热处理 7、10、15 和 21 d。

1.2.2 剥取茎尖 在超净台工作台上,将经热处理的组培苗置于双目实体解剖镜下,用经消毒的镊子和解剖刀剥取 0.2~2.0 mm 茎尖,接种到诱导茎尖分化的培养基中,10 d 后统计茎尖存活率。

1.2.3 培养基及培养条件 茎尖诱导培养基为 MS+0.5 mg/L BA+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃+3.0%蔗糖+0.7%琼脂,生根培养基为 1/2MS+1.0 mg/L IBA+0.1%活性炭+1.5%蔗糖,pH 调至 5.8~6.0。培养室温度为(25±2)℃,光强 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.4 茎尖苗脱毒效果检测 待茎尖分化成苗后,取叶片组织进行病毒检测,采用间接 ELISA 法和电镜观察法检测罗汉果茎尖苗的脱毒效果,由广西农业科学院植物保护研究所和广西大学电镜室进行病毒检测并出具检测报告。

2 结果与分析

2.1 热处理时间对试管苗的影响

将罗汉果组培苗置于 38.5℃光照培养箱进行恒温热处理。由表 1 可知,组培苗的成活率随着热处理时间的延长而下降。热处理 7~10 d 后,组培苗均出现了生长迟缓的现象,热处理 21 d 时,由于热处理时间的延长,组培苗组织受损伤程度加剧,部分组培苗因不耐持续高温处理而死亡,成活率仅为 23.33%。因此,为了保证热处理的组培苗有较高的成活率,罗汉果热处理时间应选

表1 热处理时间对组培苗的影响

热处理时间/d	热处理数/株	死亡数/个	成活数/个	成活率/%	试管苗生长情况
7	30	0	30	100.00	生长减缓,叶片颜色发黄
10	30	0	30	100.00	生长减缓,新抽生叶片小
15	30	3	27	90.00	叶片黄绿色,部分顶芽玻璃化
21	30	23	7	23.33	76.67%顶芽萎蔫死亡

择在7~15 d。

2.2 热处理时间和茎尖大小对茎尖苗脱毒效果的影响

将茎尖接种至诱导培养基后,茎尖的大小与茎尖成活率、茎尖转绿时间及茎尖成苗时间有着密切关系。由表2可知,热处理7、10和15 d,剥离同样大小的茎尖,如0.6~1.0 mm,茎尖转绿时间3、4和6 d,成活率分别为95.00%、85.00%和42.50%,成苗时间分别为11、13和16周,表明热处理时间越长,茎尖组织受到的损伤越严重,随茎尖转绿及成苗时间延长,成活率下降。而同样热处理10 d,分别剥取0.2~0.5 mm、0.6~1.0 mm和1.6~2.0 mm大小的茎尖,茎尖转绿的时间分别为5、4和3 d,茎尖成活率分别为75.00%、85.00%和100%,平均成苗时间分别为16、13和9周,说明热处理时间相同时,茎尖越小,茎尖转绿和茎尖诱导成苗的时间越长,成活率也越低。

待茎尖苗生长至株高4~5 cm时,对茎尖苗进行罗汉果花叶病毒的检测。结果表明,热处理时间及茎尖大小与茎尖苗的脱毒率密切相关。由表2可以看出,热处理7、10和15 d,剥取0.6~1.0 mm的茎尖,脱毒率分别为47.37%、73.53%和100%,说明热处理时间越长,脱毒效果越明显。热处理同样时间,如15 d时,剥取0.2~1.0 mm的茎尖,茎尖苗脱毒率均为100%,而剥取1.6~2.0 mm的茎尖,脱毒率仅为32.50%,说明热处理时间一样时,茎尖大小和脱毒率呈负相关,茎尖越小,脱毒率越高。热处理15 d剥取0.2~1.0 mm的茎尖虽然脱毒率也为100%,但成活率不足50%,仅为25.00%~42.50%,因此,要保证既要有一定的成活率,又要获得较高的脱毒,以热处理10 d剥取0.2~0.5 mm的茎尖效果最佳,成活率可达75.00%,脱毒率为100%。

表2 热处理时间和茎尖大小对茎尖培养及脱毒效果的影响

热处理时间/d	茎尖大小/mm	接种数/个	转绿时间/d	成活数/个	成活率/%	平均成苗时间/周	脱毒率/%
7	0.2~0.5	38	4	30	78.95	13	71.43
	0.6~1.0	40	3	38	95.00	11	47.37
	1.6~2.0	40	3	40	100.00	8	20.00
10	0.2~0.5	40	5	30	75.00	16	100.00
	0.6~1.0	40	4	34	85.00	13	73.53
	1.6~2.0	40	3	40	100.00	9	27.50
15	0.2~0.5	40	7	10	25.00	19	100.00
	0.6~1.0	40	6	17	42.50	16	100.00
	1.6~2.0	40	5	33	82.50	11	32.50

2.3 脱毒苗的生根与移栽

经鉴定为脱除花叶病毒的罗汉果茎尖苗经继代4~

5次后,选取长势良好的茎尖苗接种至生根培养基中进行生根诱导,当根长3 cm左右时,将已生根的试管苗拿出培养室,于室温、自然散射光下放置2~3 d后打开瓶塞练苗2~3 d,洗净根系附着的培养基成分,移入泥炭土、蛭石和珍珠岩按1:1:1比例混合而成的基质中,茎尖苗的成活率可达93.33%。

3 讨论与结论

热处理结合茎尖培养是由染病植株获得脱毒苗的有效手段^[7-9]。林治良等^[10]研究表明,不经热处理直接剥取0.8~1.0 mm茎尖和38.5℃处理2周剥取2.0 mm的茎尖,采用指示植物鉴定和电镜观察法检测,脱毒率为100%;杭玲等^[11]对经接种花叶病毒而致病的种子实生苗进行茎尖培养,结果发现,切取0.5~1.0 mm长的茎尖和热处理(38℃)2~3周再切取2.0 mm茎尖培养,采用指示植物鉴定法检测其脱毒率均为100%。该研究表明,热处理15 d剥取1.6~2.0 mm茎尖脱毒率仅为32.50%,这可能是不同的检测方法造成的结果差异。直接检测法和指示植物法操作方便简单,但不能做到快速检测,且灵敏度有限,可信度不高;电镜观察法能较快进行检测,但灵敏度有限,不能保证完全脱除病毒^[12]。ELISA法具有灵敏、快速、特异性强等优点,在脱毒苗检测中应用较多,但尚未有应用于罗汉果脱毒苗检测中的报道^[13]。该研究采用间接ELISA法和电镜观察法对脱毒结果进行检测,结果表明,热处理10 d剥取0.2~0.5 mm的茎尖可完全脱去罗汉果花叶病毒,为利用茎尖分生组织培养罗汉果脱毒苗建立繁育体系奠定了基础。

参考文献

- [1] 李典鹏,张厚瑞. 广西特产植物罗汉果的研究与应用[J]. 广西植物, 2000(3):270-276.
- [2] 蓝桃菊,许鸿源,何冰,等. 罗汉果不同器官直接分化再生苗的研究[J]. 生物技术通报,2006(增刊):514-516.
- [3] 唐学军,孙桂春. 罗汉果病毒病综合治理[J]. 广西农学报,2006,21(5):43-44.
- [4] 梁惠凌,蒋水元,李虹. 罗汉果组培苗病毒病流行因子的调查[J]. 特产研究,2008(2):51-57.
- [5] 蔡健和,秦碧霞. 罗汉果花叶病原病毒鉴定[J]. 广西科学,2001,8(1):66-69.
- [6] 秦碧霞,蔡健和. 罗汉果花叶病毒(WMV-2-Luo)抗血清制备及ELISA检测技术研究[J]. 西南农业学报,2001,14(4):14-16.
- [7] 李志强,王晶,丁国亮,等. 草莓热处理结合茎尖脱毒技术研究[J]. 北方园艺,2012(5):125-127.
- [8] 石贵玉,陈耕云,廖文雪. 毛葡萄组织培养的脱毒技术[J]. 广西师范大学学报(自然科学版),2008,26(3):71-74.
- [9] 陈云凤,黎世龄. 生姜离体脱毒快繁培养研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(6):91-92.
- [10] 林治良,陈振光. 罗汉果无花叶病苗培育[J]. 福建农业大学学报,1995,24(2):162-166.
- [11] 杭玲,陈丽娟. 罗汉果茎尖脱毒快繁技术[J]. 西南农业学报,1999,12(3):125-127.

不夜城芦荟基因组 DNA 提取方法的比较研究

刘思言¹, 姚 丹¹, 关淑艳¹, 王丕武², 宋晨雪¹

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以不夜城芦荟的幼嫩叶片为试材, 分别采用 SDS 法和 CTAB 法以及简化的 CTAB 法对基因组 DNA 进行提取, 并利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳法检测其 DNA 的浓度、纯度及质量, 以期筛选不夜城芦荟基因组 DNA 提取的最合适方法。结果表明: 对比不夜城芦荟基因组 DNA 提取的 3 种方法, 无论从提取浓度还是纯度上来看, SDS 法均明显优于其它方法。

关键词:不夜城芦荟; 基因组 DNA 提取; SDS 法; CTAB 法

中图分类号:S 682.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0104-03

芦荟(*Aloe*)属单子叶植物纲百合科芦荟属多年生多浆常绿草本植物, 也称油葱、纳会、象胆、奴会^[1], 其名称源于阿拉伯语(Alloeh), 其义是“苦而有光”, 广泛分布于热带、亚热带地区。芦荟有许多种类, 目前已知有 300 多个种, 其中比较常见的有美国库拉索芦荟、木立芦荟、中华芦荟、不夜城芦荟等, 其中不夜城芦荟因其外形美观, 近年来常常被作为观赏植物, 深受人们喜爱。

芦荟中含有近 200 种化学成分, 主要包括蒽醌类次生代谢物和芦荟多糖等^[2]。芦荟凝胶可以治疗各类皮肤病, 具有很好的抗菌消炎作用, 对心脑血管病、胃肠道溃疡疗效也较好。另外, 芦荟也常常用于美容保健、护发生发、防晒护肤等领域, 完美芦荟胶的主要成分就是芦荟凝胶。在食品工业中, 各种含有芦荟成分的饮料和酸奶等已经走入人们的生活^[3]。

随着分子生物学的发展, 很多人把目光转到芦荟的遗传转化研究方面^[4-6]。对于植物转基因研究而言, 基因组 DNA 的提取效率、尤其是 DNA 的纯度会影响试验的最终结果。因此, 确定出某种植物最适的 DNA 提取方法, 对该植物分子生物学研究具有重要的参考价值^[7-8]。该试验以不夜城芦荟为试材, 采用 SDS 法、CTAB 法以及简化的 CTAB 法提取不夜城芦荟基因组 DNA, 力求筛选省时省力又高效的不夜城芦荟基因组 DNA 提取方法, 为不夜城芦荟的分子生物学研究提供

第一作者简介:刘思言(1979-), 女, 吉林四平人, 硕士, 讲师, 研究方向为生物技术。E-mail: siyan_2001@163.com.

责任作者:王丕武(1958-), 男, 吉林蛟河人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事生物技术及作物遗传育种等研究工作。

基金项目:吉林省科技厅科技引导计划资助项目(201101111); 吉林省教育厅科学技术研究资助项目(2011-41); 吉林农业大学校内启动基金资助项目(201242)。

收稿日期:2012-10-23

[12] 付长亮, 马小军, 白隆华, 等. 罗汉果组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 325-328.

[13] 孙琦, 张春庆. 植物脱毒与检测研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2003, 34(2): 307-310.

Study on Stem Apex Detoxification of *Siraitia grosvenorii*

WU Qun-ying¹, LI Bo-lin², LI Jing-yun³

(1. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract: *Siraitia grosvenorii* in vitro was used as material in this experiment to eliminate Luohanguo mosaic virus (WMV-2-Luo) by combing tissue culture of shoot-tip with heat therapy, and detected by indirect ELISA method and electron microscope. The results showed that the suitable time for heat treatment was 7~15 days, the survival rate of tissue culture seedling was up to 90%~100%; 0.2~0.5 mm shoot-tip with heat treatment by 38.5℃ for 10 days of *Siraitia grosvenorii* were 100% free from WMV-2-Luo.

Key words: Luohanguo mosaic virus (WMV-2-Luo); stem apex detoxification; ELISA